Aus d. Pharmakolog. Institut d. Kgl. Universität München
(Vorstand: Professor Dr. H. von Tappeiner.)

JUN 22 1921

Über die Wirkung von Combinationen einiger Gifte mit Methylenblau und Eosin.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
einer hohen medizinischen Fakultät
der Kgl. bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Heinrich Carben.
appr. Arzt aus München.

München 1914
RUDOLPH MÜLLER & STEINICKE.

Gedruckt mit Genehmigung der hohen medizinischen Fakultät
der Universität München.

Referent: Herr Prof. Dr. H. v. Tappeiner.

„Die Wirkung der Farbstoffe in Verbindung mit Giften und Arzneimitteln“ betitelte Sellei eine in der biochemischen Zeitschrift 1913 erschienene Abhandlung. Seinen Versuchstieren — Meerschweinchen — injicierte er Metallsalze und andere Gifte in Verbindung mit wechselnden Mengen von Farbstoffen. Er sah hiebei, daß der Farbstoff die Wirkung des Metallsalzes nicht nur steigern, sondern auch vermindern kann. Die steigernde Wirkung ist weiter nicht auffällig. Es liegen eine Reihe von Arbeiten über Kombination von Farbstoffen mit Pharmaca vor, die an die Ehrlich'sche Vorstellung anknüpfen, daß die Farbstoffe als Schienen (Cytotrochine) wirken.

So hat Wassermann[1]) Selen mit Eosin kombiniert zur Behandlung von Mäusekarzinomen, Edelmann und v. Müller[2]) Silberverbindungen mit Methylenblau zur Behandlung septischer Prozesse, von Linden[3]) Kupfersalze mit Methylenblau zur Behandlung von Tuberkulose. Es ist wohl denkbar, daß bei solchen Kombinationen nicht nur eine Addition der Wirkung der beiden Komponenten eintritt, sondern Potenzierung. Solche Potenzierungen sind festgestellt für eine Reihe von Kombinationen, wie derartige angegeben sind von Bürgi[4]), Kochmann[5]), Jssekutz[6]), Straub[7]), Führer[8]), Goldschmidt[9]) und anderen.

Weit auffälliger muß es nun erscheinen, daß der Farbstoffzusatz in bestimmter Menge die Giftigkeit gewisser Stoffe herabsetzen kann.

Kupfersulfat tötet nach Sellei Meerschweinchen in einer Menge von 0,01 g pro 100 g Tier subcutan nach 36—48 Stunden.

„Fügt man dieser Menge 0,0015 g Methylenblau zu, bekommen die Tiere anfänglich heftigere und länger anhaltende Krämpfe als im Versuch ohne Methylenblau, bleiben aber am Leben". Eine gleiche Giftigkeitsherabsetzung fand Sellei bei Kupferchlorid + Methylenblau, bei Ferrum sulfuricum + Methylenblau usw.

Natrium vanadinicum tötet nach Sellei Meerschweinchen in einer Menge von 0,004 g pro 100 g Tier subcutan nach 21 Stunden. Zusatz von 0,0003 g Eosin steigert die Giftigkeit sehr bedeutend. Die Tiere sterben nach $5^1/_2$ Stunden. Zusatz von 0,0014 Eosin hemmt die Giftigkeit, Die Tiere sterben nach 23 Stunden.

Dieses Verhalten soll im folgenden weiter geprüft werden. In erster Linie haben wir ebenfalls mit Meerschweinchen gearbeitet, um die Ergebnisse Sellei's nachzuprüfen. Wir verwendeten als Gifte Cuprum sulfuricum, Cuprum tartaricum und Natrium vanadinicum (meta-), teils in Verbindung mit Methylenblau, teils mit Eosin.

I. Versuche an Meerschweinchen.

a.) Kupfersulfat + Methylenblau.

Die zu den Versuchen verwendeten Lösungen wurden so gewählt, daß sie in 100 ccm 0,25 Cu enthielten. Es entspricht dies ziemlich annähernd einer 1 %igen Kupfersulfatlösung, wie sie Sellei injicierte. Die Methylenblaulösung war 1 %ig und wurde in einer Menge der Metallsalzlösung zugesetzt, wie sie auch Sellei verwendete, und zwar im

I. Versuch 15 ccm zu 100 ccm Kupfersulfatlösung.

Injiciert wurde je 1 ccm des Gemenges auf 100 g Tier, wobei im Kontroll-Versuch die Kupfersulfatlösung mit der der Methylenblaulösung entsprechenden Menge Wasser verdünnt war. — Pro 100 g Gewicht erhielten die Tiere 0,002 Cu mit 0,0013 Methylenblau. Die Injektion wurde in der Weise vorgenommen, daß zuerst die Haare am Bauch des Tieres in 2 Bahnen gut entfernt wurden. An diesen haarlosen Stellen geschah dann die subcutane Injektion

langsam und vorsichtig. Darauf wurden die Einstichöffnungen einige Minuten comprimiert, damit keine Flüssigkeit zurückfließen konnte. Folgende Tabelle soll die Resultate dieses Versuchs angeben.

Nr.	Gewicht d. Tieres	Verwendete Lösung	Menge d. Lösung	Tod nach
I a	360 g	Kupfersulfat	3,6 ccm	14 Std.
I b	360 g	Kupfersulfat + Methylenblau	3,6 ccm	4 Tg. 2 Std.
II a	415 g	Kupfersulfat	4,1 ccm	3 Tg. 1 1/2 „
II b	400 g	Kupfersulfat + Methylenblau	4,0 ccm	10 Tg. 6 Std.
III a	420 g	Kupfersulfat	4,2 ccm	3 Tg.
III b	420 g	Kupfersulfat + Methylenblau	4,2 ccm	*)

*) Das Tier hat nach ca. 14 Tagen ein großes u. tiefes Geschwür am Bauch. Dieses wurde behandelt, und das Tier bleibt am Leben.

Aus der Tabelle geht hervor, daß ausnahmlos die Kupfersulfat-Methylenblautiere die Controlltiere ohne Methylenblau bedeutend länger überleben.

Dagegen sind entsprechend der Angabe von Sellei die bei der Combination des Giftes mit Methylenblau auftretenden Krämpfe stärker. Stärker und intensiver war auch die Aetzwirkung auf die Haut (tiefe Necrose), worauf besonders hingewiesen sei.

b.) Kupfertartrat + Methylenblau.

Die Kupfertartratlösung enthielt entsprechend der Kupfersulfatlösung 0,25 % Cu (= 1,9103 Cu K_2 $(C_6 H_4 O_6)_2$) Zu 100 ccm dieser Lösung wurden 15 ccm 1 % iges Methylenblau zugesetzt, resp. im Controllversuch ohne Methylenblau die entsprechende Menge Wasser. Auf 100 g Tier wurde wieder je 1 ccm des Gemisches subcutan injiciert. Nachstehende Tabelle gibt die Resultate dieser Versuchsreihe.

Nr.	Gew.d. Tieres	Verwendete Lösung	Injicierte Menge	Tod nach
Ia	350 g	Kupfertartrat	3,5 ccm	14 Std.
Ib	350 g	Kupfertartrat + Methylenblau	3,5 ccm	1 Tag 9 Std.
IIa	400 g	Kupfertartrat	4,0 ccm	13 Std.
IIb	350 g	Kupfertartrat + Methylenblau	3,5 ccm	3 Tg. 4 Std.
IIIa	250 g	Kupfertartrat	2,5 ccm	*)
IIIb	250 g	Kupfertartrat + Methylenblau	2,5 ccm	

*) Ohne Erfolg. Nach ca. 14 Tagen wurde die eiternde Wunde am Bauch in Behandlung genommen. Die Tiere blieben am Leben

Auch hier hat der Methylenblauzusatz den Eintritt des Todes stark verzögert, während die Krämpfe, sowie die nekrotisierende Wirkung an der Injektionsstelle bedeutend gesteigert waren.

Die tötlichen Dosen des Kupfersulfats und des Kupfertartrates decken sich, wenn in den Lösungen die gleichen Mengen Cu vorhanden sind.

Der verzögerte Eintritt des Todes bei Zugabe von Methylenblau zu Kupfertartrat steht im Widerspruch mit den Angaben Sellei's, der bei Kupfertartrat im Methylenblauzusatz einen giftigkeitsteigernden Faktor gefunden hat.

c.) Natrium vanadinicum (meta-) + Eosin in kleinen Dosen.

Die Natrium vanadinicum Lösung war 1 %ig.

Auf 13 ccm Natrium vanadinicum kam 1 ccm 1 %ige Eosinlösung, resp. im Controllversuch ohne Eosin die entsprechende Menge Wasser. Somit enthielten die Lösungen 0,928 % Natrium vanadinicum und 0,0714 % Eosin.

Das Verhältnis des Natrium vanadinicum: Eosin ist 1:0,075, entsprechend den Versuchen von S e l l e i mit den kleinen Eosindosen. Injiciert wurde in wechselnden Mengen von 0,45—0,41 ccm pro 100 g Tier. Die Resultate sind aus folgender Tabelle zu entnehmen.

Nr.	Gew. d. Tieres	Verwendete Lösung	Injiciert. Menge	pr. 100 g Tier	Somit pr. 100 g Tier	Tod nach
I a	375 g	Vanadin	1,7 ccm	0,45 ccm	0,004 Vanad.	10 Std.
I b	365 g	Vanadin + Eosin	1,6 ccm	0,45 ccm	0,004 Vanad. 0,0003 Eosin	7½ Std.
II a	380 g	Vanadin	1,6 ccm	0,43 ccm	0,0039 Vanad.	5 Std.
II b	380 g	Vanadin + Eosin	1,6 ccm	0,43 ccm	0,0039 Vanad. 0,0003 Eosin	4¼ Std.
III a	350 g	Vanadin	1,4 ccm	0,41 ccm	0,0038 Vanad.	21 Std.
III b	380 g	Vanadin + Eosin	1,6 ccm	0,41 ccm	0,0038 Vanad. 0,0003 Eosin	6½ Std.
IV a	310 g	Vanadin	1,3 ccm	0,41 ccm	— —	5½ Std.
IV b	335 g	Vanadin + Eosin	1,4 ccm	0,41 ccm	— —	14 Std.
V a	310 g	Vanadin	1,3 ccm	0,41 ccm	— —	9 Std.
V b	340 g	Vanadin + Eosin	1,4 ccm	0,41 ccm	— —	3 Std.
VI a	330 g	Vanadin	1,4 ccm	0,41 ccm	— —	7 Tg.
VI b	350 g	Vanadin + Eosin	1,4 ccm	0,41 ccm	— —	5 Tg.
VII a	370 g	Vanadin	1,5 ccm	0,41 ccm	— —	5 Std.
VII b	370 g	Vanadin + Eosin	1,5 ccm	0,41 ccm	— —	8 Std.
VIII a	420 g	Vanadin	1,7 ccm	0,41 ccm	— —	1 Tg. 4 Std.
VIII b	410 g	Vanadin + Eosin	1,7 ccm	0,41 ccm	— —	7 Std.
IX a	410 g	Vanadin	2,0 ccm	0,41 ccm	— —	5½ Std.
IX b	490 g	Vanadin + Eosin	2,0 ccm	0,41 ccm	— —	3½ Std.

d.) Natrium vanadinicum (meta-) + Eosin in größeren Dosen.

Die Natrium vanadinicum Lösung war 1 %ig.

Zu 13 ccm dieser Lösung wurden 5 ccm 1 %ige Eosinlösung zugesetzt resp. im Controllversuch ohne Eosin die entsprechende Menge Wasser. Somit enthielten die Lösungen 0,722 % Natrium vanadinicum und 0,28 % Eosin.

Das Verhältnis des Natrium vanadinicum: Eosin ist 1:0,39 (bei Sellei 1:0,35 in den Versuchen mit höheren Eosindosen).

Injiciert wurde in wechselnden Mengen von 0,8 bis 0,43 ccm pro 100 g Tier.

Nr.	Gew. d. Tieres	Verwendete Lösung	Injiciert. Menge	pr. 100 g Tier	Somit pr. 100 g Tier	Tod nach
I a	300 g	Vanadin	2,4 ccm	0,8 ccm	0,0056 Vanad.	4 Std.
I b	285 g	Vanadin + Eosin	2,3 ccm	0,8 ccm	0,0056 Vanad. 0,0023 Eosin	2 Std.
II a	290 g	Vanadin	1,7 ccm	0,6 ccm	0,0042 Vanad.	1¼ Std.
II b	290 g	Vanadin + Eosin	1,7 ccm	0,6 ccm	0,0042 Vanad. 0,0017 Eosin	7 Std.
III a	365 g	Vanadin	1,8 ccm	0,5 ccm	0,0035 Vanad.	8 Std.
III b	360 g	Vanadin + Eosin	1,8 ccm	0,5 ccm	0,0035 Vanad. 0,0014 Eosin	7 Std.
IV a	380 g	Vanadin	1,6 ccm	0,43 ccm	0,003 Vanad.	9 Std.
IV b	360 g	Vanadin	1,5 ccm	0,43 ccm	0,003 Vanad.	6½ Std.
IV c	385 g	Vanadin + Eosin	1,6 ccm	0,43 ccm	0,003 Vanad. 0,0012 Eosin	4 Std.

Sellei fand für die Combination von Natrium vanadinicum + kleinere Eosinmengen eine Steigerung der Giftwirkung und zwar in sehr hohem Grade, indem z. B. ein Tier nach der Injektion von Natrium vanadinicum (meta-) nach 21 Stunden

starb, nach der Injektion von Natrium vanadinicum in gleicher Menge + kleine Eosinmenge aber schon nach $5^1/_2$ Stunden.

Die Tabelle c.) zeigt in 9 Fällen 7 mal ein Resultat. das Vorausgehendem entspricht.

In 2 Fällen zeigte sich das Gegenteil, indem die Eosintiere um Stunden die Controlltiere überlebten. Wenn in den Fällen, in denen Eosinzusatz giftigkeitsteigernd gewirkt hat, unsere Resultate, was die Zeit bis zum Tod anlangt, nicht ganz mit denen von Sellei übereinstimmen, so ist doch im allgemeinen Sellei zuzustimmen, daß der Eosinzusatz hier als giftigkeitsteigernder Faktor gewirkt hat.

Sellei fand hinwiederum bei Zusatz von größeren Eosindosen zu Natrium vanadinicum eine Abnahme der Giftigkeit,

Unsere Untersuchung in dieser Richtung ergab in 4 Fällen nur 1 mal dasselbe Resultat.

3 Fälle zeigten das Gegenteil d. h. eine Verstärkung der Giftigkeit, sodaß ich betreffs Abnahme der Giftigkeit bei Zusatz größerer Eosinmengen Sellei nicht beipflichten kann. Zur Schonung des Tiermaterials konnten nicht so viele Tierversuche ausgeführt werden, wie zur Klärung dieser Sache vielleicht wünschenswert gewesen wäre.

Eine Hemmung der Wirkung von Giften durch Farbstoffzusatz konnten wir also nur bei der Combination der Kupfersalze mit Methylenblau feststellen. Dabei aber tritt die entgiftende Wirkung des Methylenblau sowohl bei Verwendung des Kupfersulfats wie bei der des Kupfertartrats (hier entgegen der Anschauung Sellei's) ein.

Da bei der subcutanen Injektion es schwierig ist, stets in die gleiche Tiefe zu injicieren, ferner da nicht stets die gleichen Stellen der Injektion gewählt werden konnten, zumal die injicierte Flüssigkeitsmenge ziemlich groß ist, können sich Versuchsfehler einschleichen, die auf der verschiedenen Resorptionsmöglichkeit der injicierten Giftmenge beruhen. Es wurden deshalb als weitere Versuchsobjekte einzellige Individuen gewählt und zwar Paramaecium caudatum.

II. Versuche mit Paramaecium caudatum.

Untersucht wurden die Combinationen Kupfersulfat + Methylenblau, Kupfertartrat + Methylenblau, Kupfertartrat + Eosin, Natrium vanadinicum (meta-) + Eosin, wobei der Farbstoffzusatz bald in kleineren, bald in größeren Mengen erfolgte.

Die Mischung der Giftkombinationen mit Paramaecien geschah in Uhrschälchen, und zwar wurde die Giftconcentration so gewählt, daß der größere Teil der Mischung aus Paramecienkultur bestand, um das milieu, in dem die Tiere zu leben gewohnt sind, möglichst zu erhalten.

Nun ist bekannt, daß sowohl Methylenblau wie Eosin Sensibilisatoren (photodynamische Stoffe) sind, und ihre Wirkung auf Zellen wie Fermente im Lichte eine wesentliche Steigerung erfährt, resp. diese biologischen Objekte lichtempfindlicher werden.

Das gleiche gilt auch für Metallsalze, von denen Neuberg nachgewiesen hat, daß sie die Lichtempfindlickeit einer Reihe chemischer Stoffe steigern.

Es wurden deshalb, um Lichtwirkungen auszuschalten, sämtliche Versuche im Dunkelzimmer angestellt, und die Wirkung auf die Paramaecien unter Benützung von Rotlicht mikroskopisch festgestellt.

a.) Kupfersulfat + Methylenblau.

Die Concentration, in der Kupfersulfat im dunklen Paramaecien — 24 Stunden lang beobachtet — nicht mehr schädigend beeinflußt, liegt auf Cu berechnet bei 1 : 500 000.

Für Methylenblau gilt das gleiche bei einer Concentration von ungefähr 1 : 300 000. Die ersten Versuche wurden, da es uns darauf ankam, zu untersuchen, ob Methylenblauzusatz die Giftigkeit des Kupfersulfats herabsetzt, — wie man es nach den Versuchen an Meerschweinchen vermuten könnte — mit einer Kupfersulfat-Concentration gemacht, die höher als der oben angegebene Grenzwert liegt und zwar mit der Concentration 1 : 80 000.

1.) Kupfersulfat i. Concentr. **1 : 80 000**
Methylenblau „ „ 1 : 2 000 000

Kupfersulfat	nach $^1/_2$ Std.	die meisten tot, die übrigen
	nach $1^1/_2$ Std.	alle tot. [rollend.
Methylenblau	nach 24 Std.	unverändert.
Kupfersulfat + Methylenblau	bereits n. einigen Minuten	starke Schädigung.
	nach $^1/_2$ Std.	alle tot.

2.) Kupfersulfat i. Concentr. **1 : 200 000**
Methylenblau „ „ 1 : 200 000

Kupfersulfat	nach $1^1/_2$ Std.	alle tot.
Methylenblau	nach 16 Std.	alle tot.
Kupfersulfat + Methylenblau	nach $1^1/_2$ Std.	alle tot.

Methylenblau i. Concentr. 1 : 2 000 000

Kupfersulfat	nach $1^1/_2$ Std.	alle tot.
Methylenblau	nach 24 Std.	unverändert.
Kupfersulfat + Methylenblau	nach $1^1/_2$ Std.	alle tot.

Methylenblau i. Concentr. 1 : 4 000 000

Kupfersulfat	nach 2 Std.	tot.
Methylenblau	nach 24 Std.	unverändert.
Kupfersulfat + Methylenblau	nach 2 Std.	tot.

Methylenblau i. Concentr. 1 : 10 000 000

Kupfersulfat	nach $1^1/_2$ Std.	tot.
Methylenblau	nach 24 „	unverändert.
Kupfersulfat + Methylenblau	nach $1^1/_4$ „	tot.

3.) **Kupfersulfat** **i. Concentr. 1 : 320 000**
Methylenblau „ „ 1 : 320 000

Kupfersulfat	nach 15 Std.	tot.
Methylenblau	nach 24 „	unverändert.
Kupfersulfat + Methylenblau	nach $^1/_2$ „	tot.

In allen Versuchen, bei denen das Kupfersulfat in einer Concentration verwendet war, die die Tiere mindestens nach 24 Stunden tötete, somit also giftig war, hat der Methylenblauzusatz, auch wenn die Menge des Methylenblau allein weit unter der Giftigkeitsgrenze lag, die Wirkung des Kupfersulfat stark gesteigert.

4.) **Kupfersulfat** **i. Concentr. 1 : 560 000**
Methylenblau „ „ 1 : 14 000

Kupfersulfat	nach 24 Std.	unverändert.
Methylenblau	nach 12 „	tot.
Kupfersulfat + Methylenblau	nach $^1/_2$ „	tot.

Methylenblau i. Concentr. 1 : 560 000

Kupfersulfat	nach 24	Std.	unverändert.
Methylenblau	nach 24	„	unverändert.
Kupfersulfat + Methylenblau	nach 1	„	tot.

5.) Kupfersulfat i. Concentr. 1 : 800 000
Methylenblau „ „ 1 : 200 000

Kupfersulfat	nach 24	Std.	unverändert
Methylenblau	nach 15	„	tot.
Kupfersulfat + Methylenblau	nach 2	„	alle tot.

Methylenblau i. Concentr. 1 : 800 000

Kupfersulfat	nach 24	Std.	unverändert.
Methylenblau	nach 24	„	unverändert.
Kupfersulfat + Methylenblau	nach 2	„	tot.

Bei den Versuchen, bei denen Kupfersulfat in Concentrationen verwendet wurde, die die Paramaecien nicht mehr töten, hat der Methylenblauzusatz die Wirkung des Kupfersulfats wiederum stark gesteigert, auch wenn die Concentration des Methylenblau so gewäht war, daß sie weit unter der Giftigkeitsgrenze lag.

b.) Kupfertartrat + Methylenblau.

Von Kupfertartrat dürfte die Concentrationsgrenze, die Paramaecien — 24 Stunden beobachtet — eben nicht mehr tötet, ungefähr bei 1 : 600 000 (berechnet auf Cu) liegen. Der Körper ist somit um ein weniges giftiger als Kupfersulfat.

1.) **Kupfertartrat** i. Concentr. **1 : 280 000**
Methylenblau „ „ 1 : 2 800 000

Kupfertartrat	nach $^1/_2$ Std.	alle tot.
Methylenblau	nach 24 „	unverändert.
Kupfertartrat + Methylenblau	nach $^1/_2$ „	alle tot.

Methylenblau i. Concentr. 1 : 8 000 000

Kupfertartrat	nach $^1/_2$ Std.	alle tot.
Methylenblau	nach 24 „	unverändert.
Kupfertartrat + Methylenblau	nach $^1/_2$ „	alle tot.

2.) **Kupfertartrat** i. Concentr. **1 : 400 000**
Methylenblau „ „ 1 : 4 000 000

Kupfertartrat	nach 1 Std.	alle tot.
Methylenblau	nach 24 „	unverändert.
Kupfertartrat + Methylenblau	nach 1 „	alle tot.

3.) **Kupfertartrat** i. Concentr. **1 : 560 000**
Methylenblau „ „ 1 : 560 000

Kupfertartrat	nach 24 Std.	tot.
Methylenblau	nach 24 „	unverändert.
Kupfertartrat + Methylenblau	nach 1 „	alle tot.

Methylenblau i. Concentr. 1 : 5 600 000

Kupfertartrat	nach 24 Std.	einzelne tote.
Methylenblau	nach 24 „	unverändert.
Kupfertartrat + Methylenblau	nach 24 „	die meisten tot.

Auch bei Kupfertartrat hat somit der Methylenblauzusatz, gleichgiltig, ob größere Mengen oder kleinere verwendet wurden, die Giftigkeit des Kupfertartrates niemals herabgesetzt.

Im Gegenteil sieht man, daß bei Verwendung von Kupfertartratmengen, die eben noch nach 24 Stunden töteten, der Methylenblauzusatz die Giftwirkung gesteigert hat, selbst noch dann, wenn er in millionenfacher Verdünnung angewendet wurde.

c.) Kupfertartrat + Eosin.

Die Kupfertartratlösung entspricht der des vorhergehenden Abschnittes b.), und die angegebenen Concentrationen sind auf Cu zu beziehen.

(1 Cu = 7,64 Cu K_2 (C_6 H_4 O_6)$_2$)

Das Eosin war stets in Concentrationen zugesetzt, die für Paramaecien ungiftig sind.

Concentration des Kupfertartrates	Eventueller Eosinzusatz	Wirkung
1 : 280 000	ohne Eosin	n. ½ Std. rollen ♂. Tiere nur mehr nach ¾ Std. tot
	mit Eosin (1 : 2 800)	„ „ „ „
	mit Eosin (1 : 14 000)	„ „ „ „
	mit Eosin (1 : 56 000)	„ „ „ „
	mit Eosin (1 : 280 000)	„ „ „ „
	mit Eosin (1 : 1 400 000)	„ „ „ „

Concentration des Kupfertartrates	Eventueller Eosinzusatz	Wirkung
1 : 400 000	ohne Eosin	1—2 Stunden bleiben die Tiere unverändert
		Nach 3—5 Stdn. ist Bewegung verlangsamt;
		nach 24 Stunden einzelne tot
	mit Eosin (1 : 1000)	nach 1 Stunde ist Bewegung sehr schwach; Tiere rollen;
		nach 2 Stunden tot.
	mit Eosin (1 : 2000)	nach 2 Stunden tot
	mit Eosin (1 : 40 000)	nach 2 Stunden rollen die Tiere.
		nach 20 Stunden tot.
	mit Eosin (1 : 400 000)	die gleiche Wirkung wie im Versuche ohne Eosin.

Auch bei der Kombination Kupfertartrat + Eosin kann von einer Wirkungshemmung des Kupfertartrates durch Eosin nicht die Rede sein.

Wenn Tartratlösungen verwendet wurden, die eben noch giftig waren, trat durch den Eosinzusatz in einer Concentration die allein ungiftig war, eine deutliche Wirkungssteigerung in Erscheinung.

d.) Natrium vanadinicum (meta-) + Eosin.

Die Natrium vanadinicum-Lösung erweist sich gegenüber Paramaecien als verhältnimäßig schwach wirksam. Diejenige Concentration, welche bei 24 stündiger Beobachtung Paramacien eben noch tötet, ist 1 : 4 000. Stärkere Verdünnungen heben nur mehr die Bewegungen der Tiere auf, die aber bei Reiz — zum Beispiel Einwirkung intensiven Lichtes — wiederum eintreten.

Die verwendeten Eosinconcentrationen waren wie im vorhergehenden Abschnitt für sich allein ungiftig.

Concentr. d. Natr. vanadinic.	Eventueller Eosinzusatz	Wirkung
1 : 2 800	ohne	nach 4 Stunden tot
	mit Eosin 1 : 700	„ ½ „ „
	mit Eosin 1 : 2 800	„ 4 „ „
1 : 3 200	ohne	„ 5 „ „
	mit Eosin 1 : 3 200	„ 5 „ „
1 : 4 000	ohne	„ 24 „ „
	mit Eosin 1 : 625	„ 1 „ „
	mit Eosin 1 : 1 000	„ 1 „ „
	mit Eosin 1 : 1 250	„ 1 „ „
	mit Eosin 1 : 2 500	„ 5 „ „
	mit Eosin 1 : 5 000	„ 10 „ „
	mit Eosin 1 : 10 000	„ 10 „ „
	mit Eosin 1 : 20 000	„ 15 „ „
	mit Eosin 1 : 40 000	„ 24 „ „
	mit Eosin 1 : 80 000	„ 24 „ „

Wiederum hat der Zusatz von Eosin in den verschiedensten Verdünnungen sowohl zu hohen Dosen von Natrium vanadinicum als zu solchen die nach 24 Stunden eben noch tötlich wirkten, niemals die Giftwirkung des Vanadins gehemmt, im Gegenteil dieselbe gesteigert.

Ueberblickt man sämtliche Paramaecien-Versuche, so sieht man, daß das, was bei subcutaner Injektion von Kupfersulfat und Kupfertartrat in Verbindung mit Methylenblau bei Meerschweinchen zu beobachten war — nämlich eine Herabsetzung der Giftwirkung dieser Kupfersalze — bei Paramaecien nicht in Erscheinung tritt, im Gegenteil eine Verstärkung der Wirkung bei der Combination vorhanden ist, die nicht nur in einfacher Ad-

dierung der Wirkung der einzelnen Giftkomponenten, sondern Potenzierung besteht. Die Mischung zweier Körper, deren Concentration so gewählt ist, daß jede für sich Paramaecien nicht mehr schädigt, wirkt tötlich.

Diese Paramaecienversuche lassen es als so gut wie unmöglich erscheinen, daß die Beobachtung an den Meerschweinchen auf einer Bindung der Kupfersalze mit dem Methylenblau, wobei das Gemenge geringer giftig ist als einer seiner Bestandteile, beruhen kann.

Dennoch wurde die Frage, ob eine solche Verbindung von Kupfersalz und Methylenblau sich bilden kann, näher untersucht.

Zur Frage über die Möglichkeit einer Complexbildung von Kupfersalz mit Farbstoff.

Eine Complexbildung müßte sich in erster Linie in einer Abnahme der Zahl der freien Jonen im Gemisch beider Substanzen äußern. Die Menge der freien Jonen einer Lösung geht bekanntlich für jedes Salz parallel der elektrischen Leitfähigkeit der Lösung und läßt sich durch deren Messung bequem bestimmen. Eine Untersuchung dieser Frage wurde so angestellt, daß zunächst die Leitfähigkeit einer reinen Kupfersulfatlösung und einer reinen Methylenblaulösung bestimmt, und danach die Kupfersulfatlösung einmal mit derselben Menge Leitfähigkeitswasser, ein andermal mit ebensoviel Methylenblaulösung versetzt, und die Leitfähigkeit beider Gemische verglichen wurde.

Da die reine Methylenblaulösung eine bei Berücksichtigung der Fehlergrenzen gegenüber der der Kupfersulfatlösung zu vernachlässigende Leitfähigkeit besaß, so lag die Frage sehr einfach: falls keine Complexbildung zwischen Kupfersulfat und Methylenblau im Sinne einer Abnahme der freien Jonen vorhanden war, so mußte die Leitfähigkeit der beiden Gemische praktisch gleich sein; wäre dagegen durch den Methylenblauzusatz eine Einschränkung der Kupfersulfat-Dissociation eingetreten, so hätte die Kupfersulfat-Methylenblau-Mischung eine geringere Leitfähigkeit zeigen müssen wie die Kupfersulfat-Wassermischung.

Die Messung der Leitfähigkeit geschah in der bekannten Anordnung von Kohlrausch mittels Inductionstroms und Wheatstone'scher Brücke.

Die Lösungen befanden sich in einem im Wasserbad von 18° tauchenden Leitfähigkeitsgefäß zwischen platinierten Elektroden. Das Ergebnis zeigt folgende Tabelle:

Lösung	Rheostaten Widerstand	Stand d. Schleifkondakt. i. mm	Widerstand der Lösung in Ω	Leitfähigkeit der Lösung
Methylenblau 1:100000	11 000 Ω	9	1 211 222	$0{,}089.10^{-6}$
Kupfersulfat 1: 20 000	9 000 Ω	158	47 962	$2{,}08\ .10^{-6}$
Kupfersulfat + Wasser (= Kupfersulf. 1:40000)	„	104	77 539	$1{,}29\ .10^{-6}$
Kupfersulfat + Methylenblau (=Kupfersulf. 1:40000, Methylenblau 1:100000)	„	106	75 906	$1{,}32\ .10^{-6}$

Wir sehen eine als gleich anzusehende Leitfähigkeit der Kupfersulfat-Methylenblau- und der Kupfersulfat-Wassermischung. Eine mit Abnahme freier Jonen einhergehende Complexbildung zwischen Kupfersulfat und Methylenblau ist also nicht nachzuweisen. Es muß daher die beobachtete Giftigkeitherabsetzung von Kupfersulfat + Methylenblau beim Meerschweinchen auf andren Momenten beruhen, und es wäre weiterhin an Aenderung der Diffusionsgeschwindigkeit zu denken, worüber der folgende Abschnitt handelt.

Zur Frage einer eventuellen Aenderung der Diffusions-Geschwindigkeit.

Zu diesem Zwecke wurde das Eindringen von Methylenblaulösungen in erstarrte Gelatine geprüft. Die 2%ige Gelatine befand sich zu je 10 ccm in Reagensgläsern mit gleichem Durchmesser. Die

Gelatine wurde mit 1 ccm einer Methylenblaulösung überschichtet, die in einer Versuchsreihe eine Concentration von $\frac{1}{1400}$ mol., in einer 2. eine Concentration von $\frac{1}{600}$ mol. und in einer 3. eine solche von $\frac{1}{350}$ mol. hatte. Die Methylenblaulösungen hatten in besonderen Reihen einen Zusatz von Kupfersulfat rsp. Kupfertartrat mit einem Kupfergehalt von 0,25 %.

Nach 2 Tagen wurde die Tiefe des Eindringens des Methylenblau in die Gelatine festgestellt. Uebereinstimmend zeigte sich, daß in den Gläsern, die das Kupfersulfat enthielten, das Eindringen des Methylenblau stark gefördert war, während in denen mit Kupfertartrat es stark gehemmt war gegenüber den Kontrollen mit Methylenblaulösung allein.

Ferner zeigte sich, daß je höher concentrierte Methylenblaulösungen verwendet wurden, um so rascher der Farbstoff eindrang, und um so intensiver die Färbung der Gelatine war.

Der Versuch zeigt somit, daß bei den verwendeten Methylenblaulösungen die Diffusiongeschwindigkeitszunahme mit der Concentration parallel geht. Daß das Kupfersulfat die Diffusion begünstigte, dürfte wohl mit der sauren Reaktion dieses Körpers zusammenhängen. Kontrollversuche aber in dieser Richtung wurden nicht gemacht.

Warum das nahezu neutrale Kupfer-Tartrat die Diffusionsgeschwindigkeit hemmte, darauf kann hier nicht weiter eingegangen werden.

Ein weiterer derartiger Diffusionsversuch wurde mit Eosin in verschiedenen Concentrationen teils ohne teils mit Zusatz von Natrium vanadinicum angestellt.

Die Eosinconcentrationen waren in der einen Versuchsreihe $\frac{1}{6000}$ mol., in einer 2. $\frac{1}{600}$ mol., in einer 3. $\frac{1}{100}$ mol. Die Concentration des zugesetzten Natrium vanadinicum war im Gemenge 0,25 %.

Wiederum zeigte sich, daß die Diffusiongeschwindigkeitszunahme mit der Eosinconcentration parallel ging.

Der Zusatz des Natrium vanadinicum förderte dieselbe bedeutend und zwar in gleicher Weise in den verschiedenen Eosinconcentrationen, so daß in dem Versuch mit der höchsten Eosinconcentration, kombiniert mit dem Natrium vanadinicum, das Eosin am tiefsten eingedrungen war.

Es entspricht das dem vorhergehenden Versuch, in dem der höchsten Methylenblauconcentration das Kupfersulfat zugesetzt war.

Wenn man die Annahme machen darf, daß mit dem Farbstoff in gleicher Weise auch das Kupfersulfat resp. das Natrium vanadinicum wandert, so würde daraus resultieren, daß durch den Farbstoffzusatz die Diffusion beschleunigt wird und zwar parallel gehend mit der Farbstoffkoncentration. Somit ist auch aus diesen Versuchen kein Moment abzuleiten, das zur Erklärung der Giftigkeitsverminderung der Combination von Kupfersalzen mit Methylenblau beim Meerschweinchen in Betracht gezogen werden könnte.

Erklärungsversuch der Giftigkeitherabsetzung von Kupfersalzen durch Methylenblauzusatz bei subcutaner Injektion.

In der Einleitung sowie im I. Abschnitte war bereits darauf hingewiesen, daß bei der subcutanen Darreichung der Combination von Kupfersalzen mit Methylenblau zwar eine starke Verzögerung des Todes der Tiere eintritt gegenüber der Darreichung der gleichen Menge von Kupfersalz allein, die nach der Injektion auftretenden Krämpfe dagegen rascher und intensiver einsetzen, und auch die örtliche Wirkung — die Necrose — stärker ist. Letzteres dürfte für die Erklärung von Wichtigkeit sein.

Durch den Methylenblauzusatz entsteht eine stärkere Reizung. Die hierdurch verursachte Hyperaemie führt zur Steigerung der Resorption, wodurch sich der raschere Eintritt der Vergiftungssymptome (Krämpfe) erklärt. Kommt es im Anschluß an den Reiz zur Zellschädigung, so ist weiterhin die Resorption gehemmt, und das noch unresorbierte Gift bleibt an der Injektionsstelle liegen, wofür das stärkere Auftreten der Necrose an der Injektionsstelle spricht.

Dem Eosin, das viel weniger oder kaum reizt, kommt daher ein dem Methylenblau analoges Verhalten nicht zu.

Nach Abschluß meiner Versuche erschien eine Arbeit aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br. von Ludwig Hassencamp: „Untersuchungen über die kombinierte Wirkung von Metallsalzen und Farbstoffen“. Auch Hassencamp verwendete als Versuchsobjekte Paramaecien.

Die Fragestellung in seiner Arbeit war aber im wesentlichen die, ob die Combination von Metallsalzen mit Farbstoffen zu einer einfachen Addition der Wirkung der einzelnen Componenten führt oder zu Potenzierung. Letzteres ist der Fall besonders in der Combination von Kupfersalzen mit Farbstoff (Methylenblau).

In der Arbeit fand besonders der Umstand Berücksichtigung, daß Methylenblau sowohl wie Metallsalze sensibilisierend wirken.

Die Fragestellung bei meiner Arbeit war vor allem die, ob bei Variation in der Concentration der gewissen Giften, besonders den Kupfersalzen, zugesetzten Farbstoffe ein Punkt zu finden ist, bei dem der Farbstoffzusatz zu einer Wirkungsverminderung führt, wie es Sellei bei Meerschweinchen gefunden zu haben glaubte.

Die Ergebnisse meiner Arbeit lassen sich dahin zusammenfassen:

Zusammenfassung.

1. Die Sellei'sche Angabe, daß der Zusatz von Farbstofflösungen in bestimmten Concentrationen zu subcutan verabreichten Giften die Wirkung derselben hemmt, konnte nur für die Combination von Kupfersalzen und Methylenblau bestätigt werden.

   Entgegen den Angaben von Sellei trifft das nicht nur für Kupfersulfat, sondern auch für Kupfertartrat zu. Eine entgiftende Wirkung von Eosin in bestimmten Concentrationen konnte nicht gefunden werden, entgegen Sellei's Angaben.
2. Bei Paramaecien führt die Combination von Kupfersulfat resp. Kupfertartrat resp. Natrium vanadinicum mit Methylenblau resp. Eosin stets zur Giftigkeitsteigerung. Diese ist so bedeutend, daß nicht nur eine Addition der Wirkung der einzelnen Componenten erfolgt, sondern eine Potenzierung.

3. Gegen die Annahme, daß die Entgiftung der Kupfersalze durch Methylenblau bei subcutaner Injektion auf der Bildung eines weniger giftigen Complexes beruhe, spricht bereits das Verhalten der Paramaecien.

   Ferner spricht dagegen die Bestimmung der Jonen in einer reinen Kupfersalzlösung und einer solchen mit Farbstoffzusatz. Der Farbstoffzusatz ändert an der Jonenkoncentration — durch Widerstandbestimmung gemessen — nichts.
4. Diffusionsversuche ergaben ebenfalls keinen Anhaltspunkt für eine Erklärung der Entgiftung durch Methylenblau.
5. Die Erklärung dürfte darin zu suchen sein, daß das Methylenblau anfänglich stark reizt und die Resorption steigert, bald aber necrotisierend wirkt und die weitere Resorption des Giftes hemmt.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im pharmakologischen Institut der Kgl. Universität München Winter- und Sommersemester 1914 ausgeführt.

Zum Schlusse fühle ich mich sehr verpflichtet, den Herren Professoren Dr. von Tappeiner und Dr. Alb. Jodlbauer für die gütige Ueberlassung des Themas und ihre jederzeit mir gewährte liebenswürdige Unterstützung bei der Arbeit meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literatur.

A. v. Wassermann, J. Keysser und M. Wassermann: Deutsche mediz. Wochenschr. 1911. S. 2389.

A. Edelmann und A. v. Müller-Deham: Deutsche mediz. Wochenschr. 1913. S. 2292.

v. Linden: Münchn. mediz. Wochenschr. 1912. S. 2560 und ibid. 1914. S. 586.

E. Bürgi: Deutsche mediz. Wochenschr. 1910. S. 62 und viele weitere Arbeiten.

M. Kochmann: Zeitschrift für experim. Pathologie und Therapie Bd. 12. S. 328 (1913).

B. v. Issekutz: Pflügers Archiv Bd. 145 7.—9. Heft.

W. Straub: Biochem. Zeitschrift 1912 Bd. 41. pag. 414.

H. Fühner: Archiv für experiment. Pathologie und Pharmakologie.

J. Sellei: Medizin. Klinik Nr. 45. 1912 S. 1837.

O. Goldschmitt: Inauguraldissert. München 1912.

Lebenslauf.

Als Sohn des k. bayr. Oberförsters Friedrich Carben wurde ich zu Wiesentheid in Unterfranken am 25. Juni 1869 geboren.

Ich absolvierte 1889 das alte humanistische Gymnasium zu Würzburg.

Nachdem ich mich anfangs mit Landwirtschaft beschäftigt, begann ich das medizinische Studium zu München und erlangte daselbst 1905 die Approbation als Arzt.